

강활(*Ostericum koreanum* Kitagawa)의 잎절편체 배양으로 부터 발생된 여러가지 형태의 체세포배를 통한 식물체 재생

조덕이* · 소응영¹

우석대학교 자연과학대학 생물학과, 전북 565-701, ¹전북대학교 자연과학대학 생물과학부, 전주시 560-756

Plant Regeneration from Somatic Embryo with Structural Diversity from Leaf Explant Culture of *Ostericum koreanum* Kitagawa

CHO, Duck Yee* · SOH, Woong Young¹

Department of Biology, Woosuk University, Chonbuk, 565-701, Korea: and

¹Department of Biological Sciences, Chonbuk National University, Chonju, 560-756, Korea. *Corresponding author.

This study was carried out in order to establish plant regeneration via somatic embryogenesis from leaf explant of *Ostericum koreanum* Kitagawa and to elucidate the effects of NAA and cytokinins (kinetin, BA) on the abnormalities of somatic embryo and the relationship between the cotyledon number and germinability. Calli were formed on leaf explants cultured on MS agar medium supplemented with various concentrations (0, 0.1, 0.5, 1, 2 mg/L) of NAA and cytokinins. The calli were white, watery and soft, became browning during cultures. Somatic embryos were formed from pale yellowish calli derived from browning calli. High frequency somatic embryos were observed on MS medium containing 1 mg/L NAA and 0.1 mg/L BA after 60 days of culture. The mature somatic embryos germinated into plantlets without subculture after 2 weeks. The frequency of normal somatic embryo with two cotyledons was 39.8%. On the other hand, cotyledonary abnormalities of somatic embryos were observed at considerable frequency: 33.6% of somatic embryo with one cotyledon, 15.3% cotyledons with three, 8.2% four cotyledons and 3.1% jar shaped cotyledon. Germination frequency of somatic embryos with two cotyledons was 97.4%, and that of the embryos with abnormal cotyledon was almost similar to that of embryos with two cotyledons, except jar shaped somatic embryos (33.3%).

Key words: anomalous cotyledon, germination, medicinal plant, *Ostericum koreanum*, somatic embryo.

서 론

강활은 산형과의 당귀속 다년생 식물로 어린순을 식용으로, 뿌리는 진통, 해열, 발한 및 빈혈 등의 치료제로 사용하고 있는 식용 및 약용식물이다. 강활의 조직배양을 통한 대량증식에 대하여 미숙종자로부터 체세포배발생을 통한 식물체 재생에 관한 보고가 있으나(Choi and Park, 1995) 재료 채취가 손쉬운 잎절편체로부터 체세포배발생을 통한 식물체 재생에 관한 연구는 이루어진 바 없다. 한편 접합자배와 기내배양에서 생산된 체세포배는 형태학적으로 차이가 있으며 주로 자엽의 구조에서 현저한 변화가 관찰되었다(Ammirato, 1977; Kageyama et al., 1990; Cho and Soh, 1995; Soh et al., 1996, 1997; Lee et al., 1997; Cho et al.,

1998). 특히 나팔모양 또는 다자엽배가 땅두릅(Lee and Soh, 1993a,b), 멜론과 대두(Choi et al., 1994ab), 시호(Cho and Soh, 1995), 당근(Soh et al., 1996, 1997; Lee et al., 1997) 및 당귀(Cho et al., 1998) 등에서 빈번하게 관찰되었다. 이와같은 체세포배는 식물체 재생율이 낮다는 사실이 밝혀져서(Wetzstein and Baker, 1993; Choi et al., 1994ab; Cho and Soh, 1995; Soh et al., 1995, 1996; Lee et al., 1997; Cho et al., 1998) 체세포배로서의 기능에 의문이 제기되었다. 그러나 땅두릅은 다자엽 체세포배에서 발아율이 높은 것으로 알려졌기 때문에(Lee and Soh, 1994b) 위에 열거한 수종의 경우를 근거로 다자엽배의 저조한 발아율을 단정 짓기는 어렵다. 따라서 강활의 경우 체세포배의 구조와 발아력의 관련성을 확인하고자 강활의 잎절편 유래 체세포배의 발생을

안정적 및 지속적인 방법으로 생산하여 식물체 재생체계를 확립하고 자엽구조와 발아의 상관관계를 밝힘으로써 인공 종자 생산을 위한 기초를 마련할 목적으로 본 실험을 시도 하였다.

재료 및 방법

전라북도 진안군에서 채취한 강활(*Ostericum koreanum* Kitagawa)의 잎을 70% 에탄올에서 1분간, 1% sodium hypochlorite 용액에서 15분간 표면살균한 후 무균수로 3회 헹구었다. 표면살균된 잎을 3 × 3 mm의 크기로 잘라서 30 mg/L 자당, 0.8% 한천 및 여러 가지 농도(0, 0.1, 0.5, 1, 2 mg/L)의 NAA와 싸이토키닌(kinetin, BA)이 첨가된 MS 기본배지(Murashige and Skoog, 1962)에 치상하였다. 한천을 넣기전에 pH 5.8로 맞추고 121°C에서 15분간 고압멸균한 배지를 100ml 삼각 플라스크에 40ml씩 분주한 다음에 일절편을 4개씩 치상하여 암처와 46 μmol s⁻¹ m⁻²의 16시간 광주기하, 25±1°C에서 배양하였다.

결과 및 고찰

체포배발생을 통한 식물체재생

강활 일절편체를 여러가지 농도(0.1, 0.5, 1, 2 mg/L)의 NAA와 싸이토키닌(BA, kinetin)이 단독 및 조합 첨가된 MS 배지에 치상하면 2주 후부터 절단면이 갈색으로 변하여 부풀면서 흰색, 연노랑색 및 갈색의 캘러스가 형성되었으며, 성장속도가 매우 느려서 캘러스가 절편체 전체에 걸쳐서 형성되는 것은 60일 후 이었다. 암배양의 경우 2 mg/L NAA와 0.1 mg/L kinetin이 첨가된 조합배지에서 흰색의 물기가 많은 캘러스가 절편체 전체에 높은 빈도로 형성되었다(Table 1). 또한 2 mg/L NAA + 1 mg/L kinetin 및 1 mg/L NAA + 0.5 mg/L kinetin 첨가 배지에서 암배양 하였을때도 노란색의 물기있는 캘러스가 형성되었으나 명배양 시는 캘러스 형성율이 현저하게 낮았다(Table 2). 일반적으로 NAA와 BA 첨가 배지에서는 kinetin 첨가와 달리 명배양의 경우 진한 갈색의 캘러스가 형성되었으며 캘러스 증식도 활발하였고(Table 3, 4) 갈색 캘러스상에 연노랑색의 배발생능 캘러스가 형성되어 싸이토키닌의 종류에 따라서 형성된 캘러스의 양, 색깔 및 정도가 달리 나타났다. 이는 더덕 주근으로부터 밝은 녹색의 단단하고 치밀한 캘러스가 증식되어 식물체 재생이 되었던 결과와(Choi et al., 1993c) 다른 현상이며 체세포배형성능 캘러스의 형태와 색깔은 식물의 종에 따라 차이를 알 수 있었다.

비배발생능 캘러스는 수분이 많으며 증식이 빠르고 희고

Table 1. Effects of NAA and kinetin on callus formation from leaf explant of *Ostericum koreanum* Kitagawa^{a,b}.

Kinetin (mg/L)	NAA (mg/L)				
	0	0.1	0.5	1	2
0	NR	NR	0.87	NR	1.14
0.1	NR	0.09	0.99	1.08	7.85
0.5	NR	0.96	2.97	3.23	5.22
1	NR	0.93	2.74	3.10	4.81
2	NR	0.87	2.32	2.47	2.76

^aThe leaf explants were cultured on MS medium supplemented with various concentrations (0, 0.1, 0.5, 1, 2 mg/L) of NAA and kinetin after 60 days of dark culture.

^bNumerical values (fresh wt.g/explant) were collected after 60 days of culture from 3 replicates each in experiments. NR=no response.

Table 2. Effects of NAA and kinetin on callus formation from leaf explants of *Ostericum koreanum* Kitagawa^{a,b}.

Kinetin (mg/L)	NAA (mg/L)				
	0	0.1	0.5	1	2
0	NR	NR	NR	NR	NR
0.1	NR	NR	NR	0.02	NR
0.5	NR	0.86	0.10	0.07	NR
1	NR	0.01	0.10	NR	0.08
2	NR	NR	NR	NR	NR

^aThe leaf explants were cultured on MS medium supplemented with various concentrations (0, 0.1, 0.5, 1, 2 mg/L) of NAA and kinetin after 60 days of light culture.

^bNumerical values (fresh wt.g/explant) were collected after 60 days of culture from 3 replicates each in experiments. NR=no response.

Table 3. Effects of NAA and BAP on callus formation from leaf explants of *Ostericum koreanum* Kitagawa^{a,b}.

BAP (mg/L)	NAA (mg/L)				
	0	0.1	0.5	1	2
0	NR	0.79	0.09	0.10	4.31
0.1	NR	NR	NR	1.34	1.53
0.5	NR	3.83	4.23	5.62	6.51
1	NR	4.32	4.59	4.79	5.82
2	NR	4.12	4.41	4.62	4.92

^aThe leaf explants were cultured on MS medium supplemented with various concentrations (0, 0.1, 0.5, 1, 2 mg/L) of NAA and BA after 60 days of dark culture

^bNumerical values(fresh wt.g/explant)were collected after 60 days of culture from 3 replicates each in experiments. NR=no response.

부드러운 캘러스였고(Fig. 1A) 배발생능 캘러스는 연노랑색이며 수분이 적고 단단하였으며 갈색의 캘러스로부터 형성되었다(Fig. 1B,C,D).

1 mg/L NAA와 0.1 mg/L BA 첨가배지에서 60일 동안 계

Table 4. Effects of NAA and BA on callus and somatic embryo formation from leaf explants of *Ostericum koreanum* Kitagawa^{a,b}.

NAA (mg/L) \ BAP (mg/L)	NAA (mg/L)				
	0	0.1	0.5	1	2
0	NR	NR	NR	0.10	NR
0.1	NR	0.16	4.73	6.35 ^{SE}	7.03
0.5	NR	4.31	4.57	4.92	5.86
1	NR	5.16	3.71	4.52	5.84
2	NR	3.86	4.33	4.51	4.92

^aThe leaf explants were cultured on MS medium supplemented with various concentrations (0, 0.1, 0.5, 1, 2 mg/L) of NAA and BAP after 60 days of light culture. SE: somatic embryo.

^bNumerical values (fresh wt.g/explant) were collected after 60 days of culture from 3 replicates each in experiments. NR: no response.

대배양없이 배양하면 배발생능 캘러스가 형성되어 동일배지에서 여러 발생단계의 배가형성되고(Fig. 1E) 2주후 발아하여 경엽부가 형성되면서(Fig. 1F, arrows) 소식물체를 이루었다(Fig. 1G). 수분함량이 적고 부스러지기 쉬운 노화한 상태의 갈변된 캘러스로부터 연노랑색 배발생능 캘러스가 형성되어 체세포배로 발달된 현상은 노화와 체세포배 형성과의 관계는 밀접한 관련성이 있음을 시사해 주고 있으며 이는 *Cichorium intybus*(Heiwegh et al., 1985), 셀러리(Nedal et al., 1990), 매실(Park and Choi, 1992), 당귀(Choi and Soh, 1993, Cho et al., 1998) 등에서도 보고된 바 있다. *Eugenia*에서도 갈변한 캘러스에서 체세포배발생이 유도되었으며(Richard, 1984) 셀러리 세포현탁배양시 계대배양의 기간이 3개월간이었을 때가 가장 배발생이 빨리 일어났다(Nedal et al., 1990). 또한 감귤의 배주 배양시 체세포배를 단기간 계대배양하면 잦은 2,4-D 첨가로 인하여 배발생능을 감소시키게 되었다(Kochba and Button, 1974). 이와같이 계대배양기간과 체세포배발생 능력과는 밀접한 관계가 있어서 계대배양기간이 짧으면 배발생능이 소실되어장기간 배양으로 인한 배지내 영양분의 소실로 인하여 캘러스가 노화된다는 보고가 있으므로(Michauxm-Ferrier and Carron, 1989) 계대배양시 배형성능 유지를 위한 최적 계대배양기간의 구명이 필요하다고 사료된다. 캘러스의 증식후 노화과정을 거쳐 체세포 배발생이 유도되는 바(Smith and Krikorian, 1989; Choi and Soh, 1993) 세포의 노화에 따른배발생능과 배지의 조성과의 관계에 관해서 구명되어야 할 것이다.

여러가지 형태의 체세포배와 식물체재생물

1 mg/L NAA + 0.1 mg/L BA 첨가배지에서 계대배양없이 60일간 배양하면 2개의 자엽을 갖는 정상배가 39.7% 형성되었으며 주발모양, 1개, 3개 및 4개의 자엽을 갖는 체세포배는 3.1%, 33.6%, 15.3%, 8.2% 등 이었다(Fig. 2). 이와같은 자엽형태의 변화는 더덕에서 고농도의 자당 첨가배지에

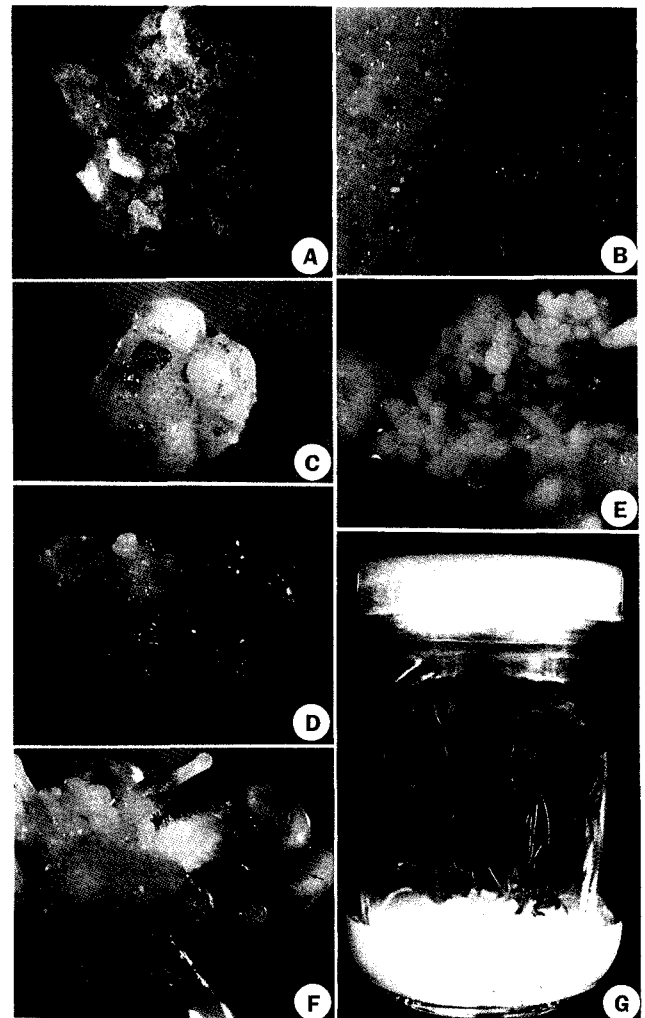


Figure 1. Plant regeneration via somatic embryogenesis from leaf explant culture of *Ostericum koreanum* Kitagawa. A: nonembryogenic callus, B,C: embryogenic callus, D,E: somatic embryos were formed on brown callus, F: somatic embryos were germinated(arrows indicate shoots), G: plant regeneration occurred for 2 weeks of culture from somatic embryos.

서 관찰되었으며(Choi et al., 1994c), 땅두릅, 대두, 시호, 당근, 및 당귀 등에서 2,4-D, 싸이토키닌과 ABA 등 식물생장조절제에 의해 비정상적인 자엽을 갖는 배형성이 일어난다고하는 보고와 한편 ABA처리에 의하여 정상적인 자엽배가 형성된다는 상반된 보고가 있다(Lee and Soh, 1993a; Choi et al., 1994b; Cho and Soh, 1995; Soh et al., 1995, 1996; Lee et al., 1997; Cho et al., Soh, 1998). 당근의 경우 2,4-D에서 유도된 배발생능 캘러스를 1/2 MS 배지에 이식하면 2주후 부터 2개의 정상자엽배, 주발모양 및 1개 자엽배 뿐만 아니라 3, 4, 및 5개의 자엽을 갖는 다자엽배가 관찰되었다(Soh et al., 1995, 1996; Lee et al., 1997). 체세포배의 형태는 자엽구조에서 여러가지 변화를 나타내고 있지만 최근까지 접합자배의 구조와 동일한 것으로 생각되어 왔으나(Steward

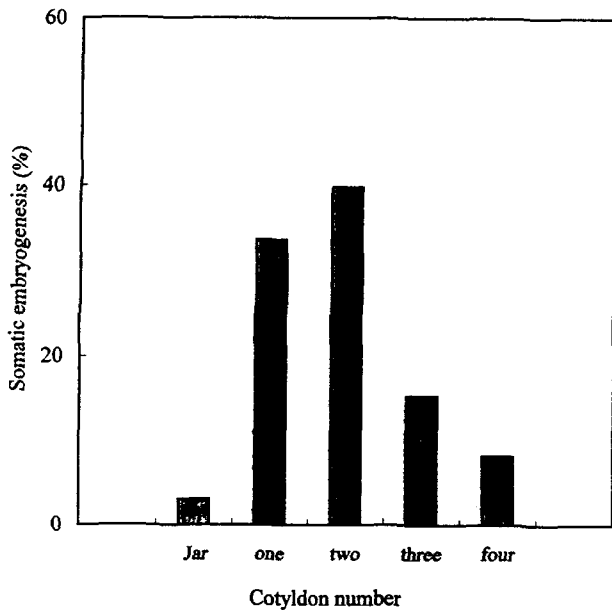


Figure 2. Somatic embryogenesis from leaf of *Ostericum koreanum* Kitagawa. Leaf explant was cultured on MS agar medium supplemented with 1 mg/L NAA and 0.1 mg/L BA. Data were collected from three replicated with 100 embryos each.

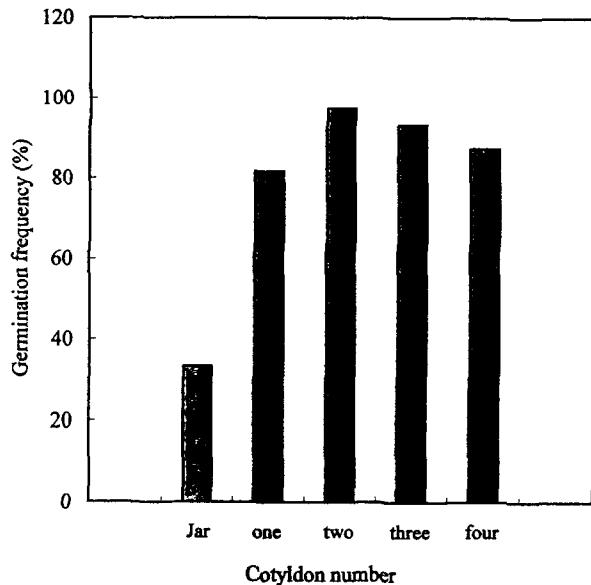


Figure 4. Germination frequency of somatic embryos formed from callus cultures of *Ostericum koreanum* Kitagawa. Cotyledonary embryos were cultured on half strength of MS agar basal medium. Data were collected from three replicates with 100 embryos each.

et al.,1958) 식물의 종과 품종에 관계없이 체세포배의 자엽 변이가 보고되고 있다.

강활의 체세포배의 자엽변이에 따르는 발아율은 2개의 자엽을 가진 정상배는 97.4%의 발아율을 보였으며 주발모양의 배, 1개, 3개 및 4개의 자엽을 갖는 체세포배의 발아는

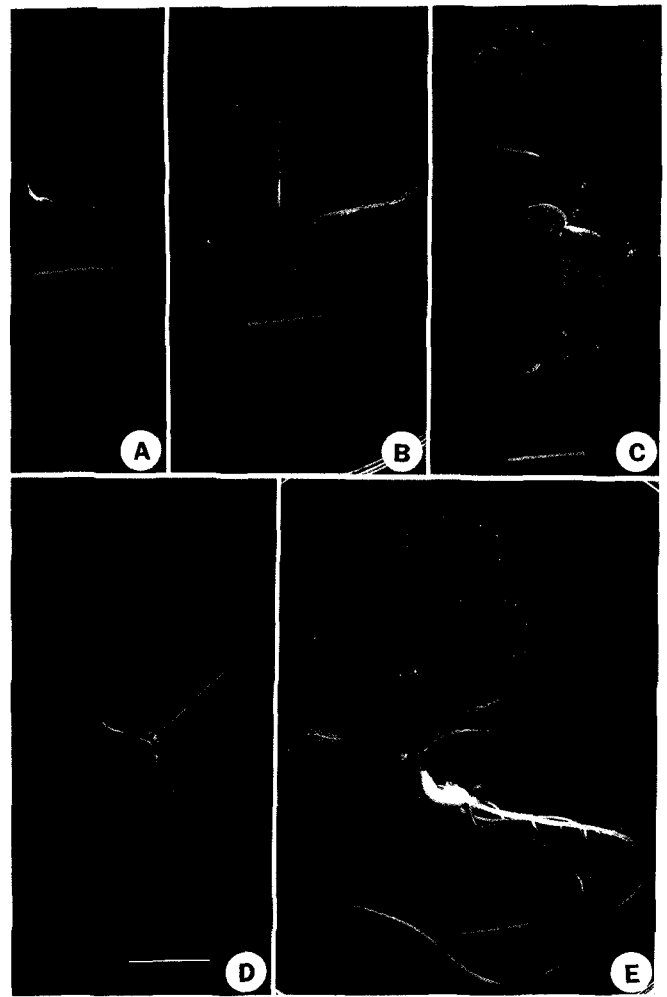


Figure 3. Somatic embryos with various type of cotyledons of *Ostericum koreanum* Kitagawa. The embryo with jar-shaped cotyledon developed root and shoot (A). Normal germination occurred in embryo with one cotyledon having multiple shoots, and with two (C), three (D), or four (E) cotyledons.

33.3%, 81.8%, 93.3% 및 87.5%로 나타나서 주발 모양배가 발아율이 가장 낮았다(Fig. 3, 4). 당근의 경우 식물체 재생율은 3개 및 4개의 자엽을 갖는 체세포배에서 정상적으로 발아한다는 보고와(Molle et al., 1993), 16%로 저조하다는 상반된 보고가 있다(Soh et al.,1996). 포도(Isabelle et al., 1993), 대두(Choi et al., 1994b), 및 더덕(Choi et al., 1994c) 등에서 비정상 자엽을 갖는 체세포배의 식물체 재생율이 자엽수에 비례하지 아니하여서 자엽수가 많을 수록 발아율이 낮았다. 시호와 당근에서 발아율을 보면 2개의 정상자엽에서 80% 및 98%이었으며 더덕에서는 2개 자엽을 갖는 체세포배의 재생율은 98%이고 다자엽 체세포배는 46%의 재생율을 보였으나 땅두릅에서는 2개 자엽 체세포배에서 발아율이 20%이었으나 다자엽 체세포배의 재생율이 40%로서 자엽수에 비례하여 재생율이 높았다(Lee and Soh, 1993b). 주발모양의 체세포배의 경우에 땅두릅, 시호 및 당근에서

0%이었으나(Lee and Soh, 1993b; Cho and Soh, 1995, Soh et al., 1996) 강활의 경우 주발모양의 배에서 33.3%로서 당근, 땅두릅, 시호 및 더덕의 경우와 다르게 재생율이 높았으며 정상적인 2개 자엽배 뿐만 아니라 1개, 3개 및 4개의 자엽을 갖는 체세포배의 발아율이 다른 식물에 비하여 높은 것은 특이한 현상으로서 식물의 종과 품종에 따라서 그 비율이 다른 것으로 사료된다.

사사-본연구는 교육부 기초과학연구소 지원 연구비(BSRI-96-4427)의 일부지원에 의해 수행되었고 실험을 도와준 전북대학교 생물과학부 이은경 대학원생에게 사의를 표한다.

적 요

강활(*Ostericum koreanum* Kitagawa)의 일절편배양으로부터 체세포배 형성을 통한 식물체 재생, 체세포배의 이상자엽에 관한 NAA와 싸이토키닌(kinetin, BA)의 영향 및 체세포배의 자엽수와 발아와의 관계를 밝히기 위하여 본 연구를 시도하였다. 배발생능캘러스는 여러 가지 농도의(0, 0.1, 0.5, 1, 2mg/L) NAA와 싸이토키닌(kinetin, BA)이 첨가된 MS배지에서 배양된 캘러스는 희고 물기가 많고 부드러웠으며 배양중에 갈변하면서 연노랑색의 배발생능 캘러스로 되었으며 이로부터 체세포배가 형성되었다. 1mg/L NAA + 0.1 mg/L BA가 첨가된 MS 배지상에서 계대배양 없이 60일간 배양하여 고빈도 체세포배를 얻을 수 있었다. 성숙한 체세포배는 계대배양 없이 동일 배지상에서 2주후 발아하여 소식물체로 되었다. 성숙한 체세포배는 2개 자엽을 갖는 정상적인 자엽배가 39.8%이었고, 주발모양, 1개, 3개 및 4개자엽배 등은 3.1%, 33.6%, 15.3% 및 8.2%이었다. 정상적인 2개 자엽 체세포배의 발아율은 97.4% 이었고 주발모양의 자엽을 갖는 체세포배를 제외하고(33.3%) 비정상 자엽배에서도 정상자엽체세포배의 발아율과 거의 비슷하였다.

인 용 문 헌

- Ammirato PV** (1977) Hormonal control of somatic embryo development from cells of caraway. Interaction of abscisic acid, zeatin and gibberlic acid. *Plant Physiol* **59**: 579-586
- Cho DY, Soh WY** (1995) Morphology of somatic embryos formed from leaf explants of *Bupleurum falcatum* L. *Korean J Plant Tissue Culture* **22**: 291-297
- Cho DY, Lee EK, Soh WY** (1998) Anomalous structure of somatic embryos developed from leaf explant cultures of *Angelica gigas* Nakai. *Korean J Plant Tissue Culture* **25(1)**: In press
- Choi EG, Park HB** (1995) High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured immature seeds of *Ostericum koreanum* Kitagawa and *Angelica purpuraeifolia* Chung. *Korean J Plant Culture* **22**: 299-305
- Choi PS, Soh WY, Cho DY, Liu JR** (1994a) High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in seedling explant cultures of melon (*Cucumis melo* L.) *Korean J Plant Tissue Culture*. **21**: 1-6
- Choi PS, Soh WY, Cho DY, Liu JR** (1994b) Somatic embryogenesis in immature zygotic embryo cultures of Korean soybean (*Glycine max* L.) cultivars and effect of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid on somatic embryo morphology. *Korean J Plant Tissue Culture* **21**: 7-13
- Choi PS, Soh WY, Cho DY, Liu JR** (1994c) Effects of carbohydrates source and osmoticum on the structural abnormality of somatic embryo of *Codonopsis lanceolata*. Abstract, Spring Meeting, Korean Society Plant Tissue Culture pp. 47.
- Choi YE, Soh WY** (1993) Effects of culture period on somatic embryo formation from callus culture of *Angelica gigas* Nakai. *Korean J Plant Tissue Culture* **20**: 199-204
- Heiwegh KMG, Banerjee N, Nerum KV, Langhe ED** (1985) Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in *Cichorium intybus* L. (witloof, compositae). *Plant Cell Reports* **4**: 108-111
- Isabelle GT, Mauro M.C, Sossountzov L, Deloire A** (1993) Arrest of somatic embryo development in grapevine: histological characterization and the effect of ABA, BAP and Zeatin in stimulating plantlet development. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **33**: 91-103
- Kageyama C, Komatsuda T, Nakajima K** (1990) Effects of sucrose concentration on morphology of somatic embryos from immature soybean cotyledons. *Plant Tissue Culture Letters* **7**: 108-110
- Kochba J, Button J** (1974) The stimulation of embryogenesis and embryoid development in habituated ovular callus from the "Shamouti" orange (*Citrus sinensis*). *Z Pflanzenzuecht* **69**: 156-162
- Lee EK, Cho DY, Soh WY** (1997) Multicotyledonary structure of somatic embryos formed from cell cultures of *Daucus carota* L. *J Plant Biology* **39**: 71-77
- Lee KS, Soh WY** (1993a) Somatic embryogenesis and structural aberrancy of embryos in tissue cultures of *Aralia cordata* Thunb. *Korean J Plant Tissue Culture* **20**: 77-83
- Lee KS, Soh WY** (1993b) Effects of cytokinins on the number of cotyledons of somatic embryos from cultured cells of *Aralia cordata* Thunb. *Korean J Plant Tissue Culture* **20**: 171-175
- Michaux-Ferriere N, Carron MP** (1989) Histology of early somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*: The importance of the timing of subcultureing. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **19**: 243-256
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**: 473-497
- Nedal BL, Altman A, Ziv M** (1990) Regulation of somatic embryogenesis in celery cell suspensions. 2. Early detection of

embryogenic potential and the induction of synchronized cell cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **20**: 119-124

Park HB, Choi EG (1992) Plant regeneration and somatic embryogenesis from immature embryo of japanese apricot(*Prunus mume* Sieb et Zucc). *Korean J Plant Tissue Culture* **19**: 261-266

Richard EL (1984) In vitro responses of adventitious embryos of two polyembryonic *Eugenia* species. *Hortiscience* **19**: 720-722

Smith DL, Krikorian AD (1989) Release of somatic embryogenic potential from excised zygotic embryos of carrot and maintainance of preembryonic culture in hormone-free medium. *Amer J Bot* **76**: 1932-1943

Soh WY, Cho DY, Lee EK (1996) Multicotyledonary structure of somatic embryos formed from cell cultures of *Daucus carota* L. *J Plant Biology*

39: 71-77

Soh WY, Cho DY, Kim KS, Sun BY (1997) Morphology of carrot somatic embryos formed in medium with abscisic acid. *J Plant Biology* **40**: 15-20

Steward FC, Mapes O, Mears K (1958) Growth and organized development of cultured cells. II Organization in cultures grown from freely suspended cells. *Amer. J. Bot* **45**: 705-708

Wetzstein HY, Baker CM (1993) The relationship between somatic embryo morphology and conversion in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Science* **92**: 81-89

(1997년 12월 15일 접수)